

Регуляция формирования соединительной ткани при спайкообразовании блокаторами медленных кальциевых каналов

Скальский С.В.¹, Соколова Т.Ф.¹, Зырянов С.К.²

¹ – ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, г. Омск

² – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», г. Москва

Резюме. Изучены фармакологические эффекты блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК): производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиаземина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) в концентрации 0,1 мг/мл культуральной среды в регуляции формирования соединительной ткани при перитонеальном спайкообразовании. Эксперименты выполнены на 89 беспородных белых крысах массой тела 230–240 г на 10-е сутки после моделирования гемоперитонеума в первичной культуре перитонеальных фибробластов и макрофагов. Установлено, что развитие спаечного процесса в брюшной полости сопровождается чрезмерной пролиферативной активностью исследованных клеток с усилением синтеза белковосвязанного оксипролина и гиалуроновой кислоты, провоспалительных цитокинов: TNF- α и IL-1. Верапамил (0,1 мг/мл) подавлял пролиферацию фибробластов, препятствовал трансформации моноцитов в макрофаги, снижал избыточную продукцию оксипролина и гиалуроновой кислоты, уменьшал синтез провоспалительных цитокинов. Дилтиазем (0,1 мг/мл) оказывал нормализующий эффект на функциональную активность перитонеальных фибробластов и макрофагов, избыточную продукцию компонентов межклеточного матрикса и цитокинов, однако эффект был менее значим (в среднем на 35,5 %, $p < 0,05$), чем у верапамила. У нифедипина (0,1 мг/мл) данный эффект отсутствовал.

Ключевые слова: верапамил, дилтиазем, нифедипин, фибробласты, макрофаги, оксипролин, гиалуроновая кислота, цитокины

Regulation of connective tissue development by calcium channel blocking agents in adhesion process

Skalskii S.V.¹, Sokolova T.F.¹, Zyryanov S.K.²

¹ – Omsk State Medical University, Ministry of Public Health, Russia

² – Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

Resume. It has been studied the pharmacological effects of calcium channel blocking agents (CCBA), the derivatives of phenylalkilamin (verapamil), benzothiazepine (diltiazem), dihydropyridine (nifedipine) at a concentration of 0,1 mg/ml of the culture medium in the regulation of connective tissues development in the process of peritoneal adhesion. The experiments were carried out on 89 non-native white rats weighing 230–240 g on the 10th day after hemoperitoneum simulation in the primary culture of peritoneal fibroblasts and macrophages. It was specified that the development of peritoneal adhesion was accompanied by excessive proliferative activity of the cells studied with the enhancement of the synthesis of protein-bound oxyproline and hyaluronic acid, the pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1. Verapamil (0,1 mg/ml) suppressed the proliferation of fibroblasts, prevented the transformation of monocytes into macrophages, reduced the excess production of hydroxyproline and hyaluronic acid, and reduced the synthesis of pro-inflammatory cytokines. Diltiazem (0,1 mg/ml) had a normalizing effect on the functional activity of peritoneal fibroblasts and macrophages, the excess production of the intercellular matrix and cytokines, but the effect was less significant (on average 35,5 %, $p < 0,05$) than in application of verapamil. In using of nifedipine (0,1 mg / ml) this effect was not detected

Keywords: verapamil, diltiazem, nifedipine, fibroblasts, macrophages, hydroxyproline, hyaluronic acid, cytokines

Автор, ответственный за переписку:

Скальский Сергей Викторович – к.м.н., доцент, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России; 644048, г. Омск, ул. В.с. Иванова, д. 15, корп. 1, кв. 32; тел. +7 (913) 601-22-11; e-mail: sergscalskiy@mail.ru

Введение

До 90 % пациентов, перенёсших большие полостные хирургические операции и, в частности, от 55 до 100 % женщин после гинекологических операций имеют ту или иную степень спаечного процесса, а большинство применяемых в настоящее время способов профилактики спайкообразования недостаточно эффективны [1, 2]. В этой связи большой интерес представляет использование лекарственных средств, способных действовать на патогенетические звенья спаечного процесса и прежде всего на основные клетки соединительной ткани — фибробласты и клетки их микроокружения.

В последние годы появились сообщения о действии блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК) на функциональную активность фибробластов и макрофагов, сопровождающуюся уменьшением образования послеоперационных эпидуральных и внутрисуставных спаек, келоидных и гипертрофических рубцов [3–5]. Однако сведений по предотвращению БМКК избыточного образования соединительной ткани в брюшной полости при асептическом воспалении брюшины практически нет. Более того, БМКК — большая и достаточно неоднородная по химической структуре группа лекарственных средств, включающая высокоспецифичные в отношении медленных кальциевых каналов

(производные фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина) и неспецифичные (производные прениламина, дифенилпиперазины и др.) препараты. Уместно предположить, что БМКК разных групп, даже в одной и той же дозе, обладают различной активностью в отношении регуляции соединительной ткани. В связи с этим возникает необходимость выявления не описанного ранее фармакологического действия у известных, зарекомендовавших себя в кардиологической практике БМКК: производных фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина на функции перитонеальных фибробластов и активность клеток микроокружения. Изучение действия фармакологических веществ непосредственно на клетки, исключаяющее влияние более сложных каскадов реакций на уровне организма, целесообразно проводить культуральным методом. Тестирование лекарственных средств на клеточных культурах, согласно Российскому законодательству и международным нормам биоэтики, является наиболее прогрессивным и этичным методом доклинических испытаний на живых системах [6].

Целью работы явилось исследование влияния БМКК верапамила, дилтиазема и нифедипина на морфофункциональные состояния фибробластов и макрофагов в культуре перитонеальных клеток крыс, перенесших гемоперитонеум.

Материалы и методы

Опыты проводились в первичной культуре перитонеальных фибробластов, инкубируемых совместно с макрофагами. Исследовали перитонеальные клетки 89 беспородных белых крыс с массой тела 230–240 г из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), которым путём введения в брюшную полость аутокрови моделировали спаечный процесс [7]. Опыты проводили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.77 и № 701 от 27.07.78 об обеспечении принципов гуманного обращения с экспериментальными животными. На 10-е сутки гемоперитонеума для извлечения клеток перитонеальную полость забитых животных дважды промывали 10 мл среды RPMI-1640, содержащей 250 ЕД гепарина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 ЕД/мл стрептомицина. Образцы перитонеальных смывов центрифугировали при 800 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеточных элементов, которые затем трижды отмывали средой RPMI-1640 («Sigma») с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 % глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Клеточные суспензии, содержащие 90–95 % живых клеток, эксплантировали в чашки Петри диаметром 40 мм с покровными стеклами, обработанными поли-D-лизином, в 5 мл полной ростовой среды вышеуказанного состава по 2×10^6 ядросодержащих клеток на мл среды. Проведено 2 серии экспериментов. В 1-й серии в культуре исследовали активированные *in vivo*,

при моделировании гемоперитонеума, фибробласты и макрофаги (основная группа) и неактивированные перитонеальные клетки, забранные у интактных крыс (группа сравнения). Во 2-й серии исследовали влияние БМКК на культуру активированных фибробластов и клеток их микроокружения. Клеточные культуры 2-й серии были разделены на 3 пула клеток, составлявших исследовательские группы. К культуре клеток 1-й группы добавляли верапамил (0,1 мг/мл), 2-й группы — дилтиазем (0,1 мг/мл), 3-й группы — нифедипин (0,1 мг/мл). В эксперименте использовали раствор верапамила 0,25 % концентрации в ампулах по 2 мл производства ОАО «Биосинтез», г. Пенза, Россия; раствор дилтиазема (Diltiazem Hydrochloride Injection) производства компании Hospira во флаконах по 10 мл в концентрации 5 мг/мл; раствор нифедипина (Адалат) производства компании Bayer, Германия, во флаконах по 50 мл в концентрации 100 мкг/мл). Контролем служила культура активированных фибробластов и макрофагов без добавления в ростовую среду лекарственных средств (основная группа 1-й серии экспериментов). После внесения в чашки Петри суспензии клеток и добавления БМКК в ростовую среду, чашки помещали в CO₂-инкубатор на 24 ч ($t - 37^\circ\text{C}$, 5 % CO₂). По окончании культивирования среду сливали, центрифугировали (1 500 об/мин, 10 мин), в супернатантах определяли количество оксипролина и гиалуроновой кислоты, цитокинов: фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1). Покровные стекла окрашивали по Романовскому–Гимза. Микроскопию проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа «Zeiss» (Германия) при иммерсионном увеличении $\times 1\,000$. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов путём определения митотического индекса (МИ). Исследование макрофагальной трансформации моноцитов проводили по Т.А. Демченко [8]. Содержание цитокинов TNF- α , IL-1 β в культуральной жидкости определяли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы «Иммунотех» (Франция) на планшеточном фотометре «Multiscan» (Финляндия). Основную коллагенсинтетическую функцию фибробластов оценивали по наличию в культуральной среде оксипролина — маркера коллагена. Содержание свободного, суммарного оксипролина и белковосвязанного оксипролина определяли по П.Н. Шараеву [9]. Степень стимуляции коллагеногенеза фибробластами в культуре клеток оценивали по количеству белковосвязанного оксипролина. О синтезе гликозаминогликанов фибробластами судили по количеству гиалуроновой кислоты в культуральной жидкости, которую определяли по П.Н. Шараеву с соавт. [10]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel и Statistica 6,0 для Windows. Анализ характера распределения полученных данных осуществляли по критерию Шапиро–Уилка. Определя-

лись средняя арифметическая величина (M) и ошибка средней (m). Достоверность различий выявляли по критерию Стьюдента. Критический уровень значимости был принят на уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Морфологические и функциональные характеристики перитонеальных фибробластов и макрофагов в культуре клеток представлены в табл. 1. Выявлено, что в культуре клеток, полученной от интактных крыс группы сравнения, пролиферативная активность фибробластов через 24 ч культивирования была низкой. У фибробластов, полученных от крыс основной группы, через 10 сут после моделирования гемоперитонеума, активность митотического процесса в культуре клеток была высокой, она в 5,3 раза ($p < 0,05$) превышала показатели в группе сравнения. При изучении коллагеносинтетической функции фибробластов выявлено, что в основной группе наблюдалось стимулирование образования белковосвязанного оксипролина. Установлено повышение уровня синтеза оксипролина активированными фибробластами основной группы в 4,2 раза по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$). Анализ гиалуроновой кислоты — одного из основных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани, также выявил увеличение её содержания в супернатантах клеточных культур активированных фибробластов. Отмечено 3-кратное увеличение синтеза гиалуроновой кислоты в культуре активированных клеток крыс основной группы ($p < 0,05$).

Исследование клеток микроокружения (моноцитов и макрофагов) перитонеальных фибробластов выявило, что моноциты, полученные от крыс на 10-е сутки гемоперитонеума, демонстрировали в культуре высокую способность к трансформации в макрофаги (см. табл. 1). В течение 24 ч культивирования $60,5 \pm 3,1$ % из них дифференцировались в макрофаги, что в 2,5 раза превышало показатели группы сравнения. Следствием активации макрофагов при моделировании асептического воспаления брюшины является усиленная секреция ими цитокинов, прежде всего провоспалительного характера: TNF- α и IL-1. Наи-

более выраженные отклонения регистрировались при определении количества TNF- α , которое превышало контрольные значения в 19 раз (табл. 1). Это согласуется с имеющимися данными о биологических свойствах данного цитокина, о его участии в процессах деструкции и репарации, сопутствующих воспалению, способности TNF- α индуцировать пролиферацию фибробластов и синтез коллагена при активации фиброгенеза на этапах завершения воспаления [11, 12]. Известно, что высокая концентрация TNF- α влечёт за собой хроническое воспаление, способствует неблагоприятному течению патологического процесса и является ключевым фактором в развитии спаечной болезни [13]. Наряду с усилением выработки TNF- α , в культуре клеток основной группы наблюдалось изменение уровня IL-1, которое достигало 3,6-кратного увеличения по сравнению с группой сравнения (см. табл. 1). Известно, что IL-1 индуцирует пролиферацию фибробластов и такие изменения их функционирования способствуют развитию фиброза [14]. Под влиянием IL-1 усиливается формирование рубцов, связанное с повышенным образованием соединительной ткани [15].

Исследования, проведённые во 2-й серии экспериментов по определению влияния БМКК (верапамила, дилтиазема, нифедипина) на культуру активированных фибробластов и макрофагов, выявили, что добавление верапамила к культуре клеток (1-я группа) в концентрации 0,1 мг/мл предотвращало чрезмерную активацию фибробластов и клеток моноцитарно-макрофагального ряда (табл. 2). В присутствии верапамила количество оксипролина и гиалуроновой кислоты в культуральной среде через 24 ч инкубации также было ниже (1-я группа), чем в контроле. Исследование уровней TNF- α и IL-1 выявило, что введение в культуру клеток верапамила предотвращало повышение наработки данных цитокинов (см. табл. 2).

Выявление наличия фармакологического эффекта у дилтиазема в концентрации 0,1 мг/мл в отношении перитонеальных фибробластов и макрофагов, оценка его выраженности по сравнению с верапамилем показали, что дилтиазем, хотя и снижает чрезмерную функциональную активность данных клеток соединительной ткани, но его нормализующее действие менее выраже-

Таблица 1

Морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов и макрофагов ($M \pm m$)

Показатели	Группы	
	основная	сравнения
МИ фибробластов, %	$12,3 \pm 0,4^*$	$2,3 \pm 0,2$
Оксипролин, мкмоль/л	$26,7 \pm 1,7^*$	$6,5 \pm 0,4$
Гиалуроновая кислота, ммоль/л	$1,6 \pm 0,12^*$	$0,5 \pm 0,03$
МТМ, %	$60,5 \pm 3,1^*$	$24,1 \pm 5,2$
TNF- α , пг/мл	$321,3 \pm 21,1^*$	$17,1 \pm 1,8$
IL-1, пг/мл	$54,4 \pm 4,2^*$	$14,9 \pm 2,1$

Примечание: * — достоверность различий между группами, $p < 0,05$

Таблица 2

Влияние БМКК на морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов и макрофагов ($M \pm m$)

Показатели	Верапамил	Дилтиазем	Нифедипин
МИ фибробластов, %	$5,1 \pm 0,1^*$	$9,4 \pm 0,3^*$	$11,5 \pm 0,3$
Оксипролин, мкмоль/л	$8,9 \pm 0,2^*$	$14,3 \pm 1,1^*$	$23,1 \pm 0,5$
Гиалуроновая кислота, ммоль/л	$0,98 \pm 0,05^*$	$1,28 \pm 0,06^*$	$1,48 \pm 0,08$
МТМ, %	$36,2 \pm 2,6^*$	$47,3 \pm 2,9^*$	$56,1 \pm 3,4$
TNF- α , пг/мл	$97,4 \pm 6,8^*$	$198,1 \pm 10,1^*$	$271,2 \pm 14,2$
IL-1, пг/мл	$27,1 \pm 2,6^*$	$39,8 \pm 2,3^*$	$47,4 \pm 3,9$

Примечание: * – достоверность различий между 1-й группой (верапамил), 2-й группой (дилтиазем), 3-й группой (нифедипин) и контролем (основная группа, табл. 1), $p < 0,05$.

но, чем у верапамила (см. табл. 2). Добавление к культуральной среде дилтиазема в концентрации 0,1 мг/мл приводило к статистически значимому в сравнении с контролем снижению уровней митозов фибробластов, макрофагальной трансформации моноцитов, коллагена и гиалуроновой кислоты, TNF- α и IL-1 ($p < 0,05$). Нифедипин в концентрации 0,1 мг/мл не оказывал действия на культуру активированных фибробластов и макрофагов, не влиял на количество оксипролина и гиалуроновой кислоты, уровни TNF- α и IL-1. Различия между группами с нифедипином (3-я группа) и контролем были статистически недостоверны (см. табл. 2).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлено, что при развитии спаечного процесса в брюшной полости через 10 дней после моделирования гемоперитонеума наблюдалась чрезмерная активация перитонеальных фибробластов и усиление функциональной активности клеток микроокружения – макрофагов при совместном их культивировании *in vitro*. Активация фибробластов реализовалась 5,3-кратным увеличением митотической активности клеток ($p < 0,05$) и синтеза ими основных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани: 4,2-кратным повышением уровня оксипролина ($p < 0,05$) и 3-кратным – гиалуроновой кислоты ($p < 0,05$). Избыточная активность макрофагов проявлялась 2,5-кратным ростом макрофагальной трансформации моноцитов ($p < 0,05$), 19-кратным увеличением количества TNF- α ($p < 0,05$), 3,6-кратным – IL-1 ($p < 0,05$).

Исследование не описанного ранее фармакологического действия БМКК на клетки соединительной ткани показало, что верапамил и дилтиазем оказывали различное нормализующее влияние на усиленную асептическим воспалением брюшины пролиферативную активность и основную синтезирующую функцию фибробластов и макрофагов. Наиболее выраженный модулирующий эффект на культуру клеток оказывал верапамил в концентрации 0,1 мг/мл. Выявленные фармакологические эффекты верапамила в отношении перитонеальных фибробластов реализовались прямым угнетением пролиферативной и синтетической активности последних, а также моделированием функциональной активности их микроокружения, прежде

всего клеток системы мононуклеарных фагоцитов. В культурах фибробластов и макрофагов, инкубируемых с верапамилем, активность митотического процесса уменьшалась более значимо, чем с дилтиаземом. Синтез белковосвязанного оксипролина, гиалуроновой кислоты, TNF- α и IL-1 в культуре активированных клеток при действии верапамила также был ближе к показателям в культуре клеток интактных крыс, чем при действии дилтиазема. Результаты исследований *in vitro* позволяют утверждать, что присутствие в инкубационной среде таких БМКК, как верапамил и дилтиазем, оказывают дозозависимое влияние на морфофункциональные характеристики перитонеальных клеток в культуре, течение процессов пролиферации и синтеза компонентов межклеточного матрикса, провоспалительных цитокинов. У нифедипина эффекта влияния на клетки соединительной ткани (чрезмерную пролиферативную и синтетическую активность перитонеальных фибробластов и макрофагов) выявить не удалось. Различия между изученными показателями в культурах клеток с добавлением нифедипина и без него были статистически недостоверны.

Выводы

1. Моделирование гемоперитонеума вызывает повышение (в среднем 6-кратное) пролиферативной активности фибробластов в культуре, их коллаген-синтетической функции, продукции ими гиалуроновой кислоты, усиливает функциональную активность макрофагов, увеличивая темпы их трансформации из моноцитов, синтез провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1.

2. Верапамил (0,1 мг/мл) в культуре клеток тормозит чрезмерную при гемоперитонеуме митотическую активность перитонеальных фибробластов и макрофагальную трансформацию моноцитов, снижает избыточную продукцию оксипролина и гиалуроновой кислоты, уменьшает синтез провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1.

3. Дилтиазем (0,1 мг/мл) оказывает менее значимый (в среднем на 35,5 %, $p < 0,05$), чем верапамил, нормализующий эффект на функциональные показатели фибробластов и макрофагов в культуре.

4. У нифедипина (0,1 мг/мл) эффект влияния на клетки соединительной ткани в культуре на этапе пролиферации и завершения процесса воспаления при гемоперитонеуме отсутствует. Нифедипин не тормозит

чрезмерную митотическую и коллагенсинтетическую активность перитонеальных фибробластов, не обеспечивает ограничение макрофагальной трансформации моноцитов, избыточной продукции TNF- α , IL-1.

Литература

1. Дронов А.И., Задорожная К.О., Дронова В.Л. и соавт. Патогенез, осложнения и контроль перитонеального спаечного процесса в гинекологии и хирургии. Хирургия. Восточная Европа 2015; 2 (14): 124–129.
2. Robertson D., Lefebvre G. Adhesion Prevention in Gynaecological Surgery. Clinical Practice Guideline. JOGC 2010; 32: 6: 598–602.
3. Li Y., Ma X Yu P. et al. Intra-articular adhesion reduction after knee surgery in rabbits by calcium channel blockers. Med Sci Monit. 2014; 20: 2466–2471.
4. Wang R., Mao Y., Zhang Z. et al. Role of verapamil in preventing and treating hypertrophic scars and keloids. Int Wound J. 2015; doi: 10.1111/iwj.12455.
5. Wang Z., Wang Y., Xie P. et al. Calcium channel blockers in reduction of epidural fibrosis and dural adhesions in laminectomy rats. Eur J Orthop Surg Traumatol. 2014; 24: 1: 293–298.
6. Волова Л.Т. Биологическая система оценки качества биоимплантатов с помощью клеточных технологий. Успехи современного естествознания. 2008; 5: 86–87.
7. Скальский С.В., Шамрай Г.А., Долгих Т.И. и соавт. Экспериментальная модель перитонеального спайкообразования. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007; 10: 19–20.
8. Демченко Т.А. Определение феномена макрофагальной трансформации мононуклеарных клеток в культуре лейкоцитов крови для оценки иммунологического состояния организма. Методические рекомендации. Л.: Ленуприздат, 1980; 14.
9. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. Лабораторное дело 1990; 5: 283–285.
10. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Гунчев В.В. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях. Клин. лаб. диагностика. 1996; 3: 21–22.
11. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. Санкт-Петербург: Фолиант. 2008; 549.
12. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Медицинский академический журнал. 2013; 3: 18–41.
13. Филленко Б.П., Земляной В.П., Борсак И.И. и соавт. Спаечная болезнь: профилактика и лечение, С-П.: 2013: 171.
14. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. Санкт-Петербург: Фолиант, 2011: 480с.
15. Пигарева Н.В., Королькова Т.Н., Симбирцев А.С. и соавт. Уровень цитокинов у пациентов с рубцами после акне. Эксперим. и клиническая дерматокосметология. 2011; 3: 3–6.